

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of)	
)	
H. Müller-Hartmann et al)	
)	
Serial No. n/a)	Examiner: n/a
)	
Filed: herewith)	Group Art Unit: n/a
)	
For: Container With at Least One)	Atty. Dkt.: 3029-101
Electrode)	

SUBMISSION OF
AMENDMENT UNDER PCT ARTICLE 19;
ANNEX TO THE IPER AND TRANSLATION THEREOF

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Attached hereto is an amendment under PCT Article 19 that was timely filed with International Bureau for international application PCT/DE03/00536 (Annex to the IPER) and a verified translation thereof.

The claims of the translation of the Article 19 amendment attached hereto substitute the claims on pages 27 to 31 of the translation of international application PCT/DE03/00536 submitted herewith, which are further amended by the preliminary amendment attached hereto.

National Stage of PCT/DE03/00536

No fees are believed to be due. However, the Commissioner is authorized to charge any fee required in connection with this filing to Deposit Account No. 50-3135.

Respectfully submitted,

By 

Joyce von Natzmer
Attorney for Applicants
Registration No. 48,120
Telephone: (301) 657-1282

Joyce von Natzmer
4615 North Park Avenue
Suite 919
Chevy Chase, MD 20815
August 20, 2004

10/505149

DT15 Rec'd PCT/PTO 20 AUG 2004

VERIFICATION OF TRANSLATION**Re: International Patent Application No. PCT/DE03/00536**

I, Dr. Alvaro Remus
Mörsenbroicher Weg 200
40470 Düsseldorf
Germany

hereby declare that I am conversant with the German and the English languages and that I am the translator of the documents attached and certify that to the best of my knowledge and belief the following is a true and complete translation of

the amendments to the claims filed with the International Bureau of WIPO under Article 19 (1) PCT with respect to International Patent Application No. PCT/DE03/00536 filed in the name of amaxa GmbH et al.

Dated: 13 August 2004

Signature: _____

Dr. Alvaro Remus

Dr. rer. nat. Alvaro Remus

**Patentanwalt
European Trademark Attorney**

**Mörsenbroicher Weg 200 · 40470 Düsseldorf
Tel. 0211-69 155 08 · Fax 0211-69 155 09
e-mail: pa.remus@t-online.de**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/DE2003/000536



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

20 AUG 2004

Applicant's or agent's file reference A02 110 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE2003/000536	International filing date (day/month/year) 20 February 2003 (20.02.2003)	Priority date (day/month/year) 20 February 2002 (20.02.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12M 3/00, C12N 15/87, 15/64		
Applicant AMAXA GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 September 2003 (04.09.2003)	Date of completion of this report 07 April 2004 (07.04.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE2003/000536

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-28 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-25 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1-17 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.
PCT/DE 03/00536

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: US-A-6 040 184

D2: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 1999, No. 09,
30 July 1999 & JP 11 103858

D3: WO 01 70928

D4: EUROAGENTEC: 'Easyject Plus User's Manual Passage'
10 July 1992, PAGE(S) 1-27, 30-39, XP002200115.

2. The amendments submitted to the International Bureau in accordance with PCT Article 19(1) do not introduce substantive matter that goes beyond the disclosure in the international application as filed (PCT Article 19(2)).

3. The claimed invention is not disclosed in any of the search report citations and also cannot be derived therefrom in an obvious manner.

Document D1 discloses a method for transferring nucleic acids and other biologically active molecules into the nucleus of higher eukaryotic cells with the aid of an electric current. The cells are incubated in a cuvette with an inter-electrode gap of 2 mm (see examples).

Document D2 describes a cuvette consisting of transparent plastics material, with wall electrodes (see abstract).

Document D3 relates to a method for the electroporation of cells using electrical field pulses of long duration. This document also uses the cuvettes with aluminum electrodes and inter-electrode gap of 2 mm.

Document D4 discloses cuvettes with aluminum electrodes for electroporation (see pages 12-13).

The subject matter of claim 1 relates to a container for receiving an aqueous solution, characterized in that at least one electrode consists of a conductive plastics material based on at least one synthetic material, which is doped with at least one conductive material, the doping being present in the synthetic material in a total concentration of 40-80 percent by weight.

Therefore, the subject matter of claim 1 is novel within the meaning of PCT Article 33(2).

4. The subject matter of claim 1 also cannot be derived in an obvious way from the search report citations (PCT Article 33(3)). The reasons are as follows:

The containers known from the prior art are used in electroporation or electrofusion in the form of cuvettes with inserted metallic electrodes. Here the electrodes consists mainly of metal, with aluminum frequently being used. These known, commercially available cuvettes have the disadvantage that metal ions are transferred into the buffer solution upon

electrical discharge. In low concentrations, these ions can lead to an undesired stimulation of the cells and, in higher concentrations, they can have a toxic effect on the cells.

In the container according to the invention, the use of a conductive plastics material consisting of a doped synthetic material, the doping substance being present in the synthetic material in a total concentration of 40-80 percent by weight, prevents the release of metal ions, thus preventing toxic effects on living cells. In this way, it is also possible to increase the medical compatibility of the resulting products.

Surprisingly, it was found that, when using the doped synthetic materials used in electroporation, the transfection efficiency was improved over that obtained with aluminum electrodes.

5. Claims 2-19 are dependent upon claim 1 and thus also satisfy the PCT requirements with respect to novelty and inventive step. The same applies to claims 2-25, which relate to the use and production of the claimed containers.

Claims

1. Container (20, 30) for receiving an aqueous solution, and in particular
5 cells, derivatives of cells, subcellular particles and/or vesicles, which is
formed at least partially by an outer limit (21) forming an inner chamber
(22, 32) for receiving said solution, and which comprises at least one area
which acts as an electrode (25, 26, 33, 34) when an electric voltage is
applied and a subsequent discharge occurs, wherein at least one
10 electrode (25, 26, 33, 34) is made of a conductive synthetic material at
least based on a plastic material which is doped with at least one
conductive substance.
2. Container according to claim 1, wherein said dope consists of carbon
15 fibers, graphite, soot, carbon nanotubes and/or an intrinsically conductive
synthetic material.
3. Container according to claim 1 or 2, wherein the overall concentration of
said dope in said plastic material is 10 – 80 % w/w, preferably 20 – 60 %
20 w/w, more preferred 40 – 60 % w/w, most preferred 50 – 60 % w/w, in
particular 55 – 60 % w/w.
4. Container according to claim 1, 2, or 3, wherein the overall concentration
of said dope in said plastic material is 40 – 80 % w/w, preferably 50 – 80 %
25 w/w, more preferred 60 – 80 % w/w, most preferred 70 – 80 % w/w, in
particular 74 – 76 % w/w.
5. Container according to any one of the claims 1 to 4, wherein said plastic
material is polycarbonate, polyetheretherketone, polypropylene,
30 polyamide, polyphenylensulfide or a mixture of these polymers, or at least
based on one or several of these polymers, and/or wherein said plastic
material is an intrinsically conductive synthetic material.

6. Container according to any one of the claims 2 to 5, wherein said intrinsically conductive synthetic material is polyaniline, polyacetylene, poly-para-phenylene, poly-para-phenylensulfide, polypyrroles, polythiophene, polypropylene or the like, or at least based on one or several of these polymers.
5
7. Container according to any one of the claims 1 to 6, wherein said outer limit (21, 31) is made of synthetic material, preferably transparent plastic material.
10
8. Container according to claim 7, wherein said outer limit (21, 31) is made of the same plastic material as the plastic material on which said at least one electrode (25, 26, 33, 34) is based.
15
9. Container according to any one of the claims 1 to 8, wherein said at least one electrode (25, 26, 33, 34) is integrated into said outer limit (21, 31).
10. Container according to any one of the claims 1 to 9 comprising at least two electrodes (25, 26, 33, 34) being made of the same material.
20
11. Container according to any one of the claims 1 to 10, wherein at least two electrodes (25, 26, 33, 34) are made of different materials.
- 25 12. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polyamide, in particular polyamide 66 or polyamide 6, doped with 25 - 45 % w/w, preferably 30 - 40 % w/w, in particular 33 - 37 % w/w, carbon fibers and 15 - 35 % w/w, preferably 20 - 30 % w/w, in particular 23 - 27 % w/w, graphite.

13. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polyamide, in particular polyamide 66 or polyamide 6, doped with 30 - 50 % w/w, preferably 35 - 45 % w/w, in particular 39 - 41 % w/w, carbon fibers and 25 - 45 % w/w, preferably 30 - 40 % w/w, in particular 34 - 36 % w/w, graphite.
14. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polycarbonate doped with 15 - 40 % w/w, preferably 20 % w/w, carbon fibers and 1 - 40 % w/w, preferably 15 % w/w, graphite.
15. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polyetheretherketone doped with 30 - 50 % w/w, preferably 40 % w/w, carbon fibers.
16. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polyamide, preferably polyamide 66, doped with 20 - 40 % w/w, preferably 30 % w/w, carbon fibers.
17. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polypropylene doped with 15 - 40 % w/w, preferably 20 % w/w, carbon fibers.
18. Container according to any one of the claims 1 to 11, wherein at least one electrode (25, 26, 33, 34) is made of polyphenylensulfide doped with 30 - 50 % w/w, preferably 40 % w/w, carbon fibers.
19. Container according to any one of the claims 1 to 18, wherein said outer limit (21, 31) comprises at least one opening for supplying said solution and at least one opening for draining off said solution.

20. Container arrangement comprising at least two, preferably 6, 12, 24, 48, 96 or more, containers (20, 30) according to any one of the claims 1 to 18 being joined to build one unit.
- 5
21. Method for production of containers or container arrangements according to any one of the claims 1 to 20, wherein said container (20, 30) or said container arrangement is produced by two-component injection moulding, wherein at first the outer limit (21, 31) is injection-moulded leaving one recessed window and the conductive synthetic material being made of doped plastic is subsequently injection-moulded into said at least one window, or wherein at first said at least one electrode (25, 26, 33, 34) is injection-moulded of said doped plastic material and said outer limit (21, 31) is subsequently injection-moulded around said at least one electrode (25, 26, 33, 34).
- 10
- 15
22. Method for treatment of cells, derivatives of cells, subcellular particles and/or vesicles by means of electric current, in particular for electroporation or electrofusion, comprising:
- 20
- 25
- 30
- a) Transferring said cells, derivatives of cells, subcellular particles and/or vesicles into an inner chamber (22, 32) of at least one container (20, 30) according to any one of the claims 1 to 19 or at least one container of a container arrangement according to claim 20, wherein said container (20, 30) comprises at least one electrode (25, 26, 33, 34) being made of a doped synthetic material, and at least one further electrode (25, 26, 33, 34), and
- b) Applying voltage to said electrodes (25, 26, 33, 34) and generating a current flow in said inner chamber (22, 32) of said container (20, 30).
23. Method according to claim 22, wherein said electric current reaches a current density up to 120 A/cm^2 , preferably 80 A/cm^2 .

24. Method according to claim 22 or 23, wherein biologically active molecules, in particular nucleic acids, are solved in said solution, and transfer of said biologically active molecules into living cells is achieved by means of a voltage pulse having a field strength of 2 to 10 $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ and a duration of 10 to 200 μs .
25. Method according to claim 24, wherein said transfer of said biologically active molecules into said cells is achieved by a current flow following said voltage pulse without interruption, having a current density of 2 to 14 $\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, preferably 5 $\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, and a duration of 1 to 100 ms, preferably 50 ms.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 08 APR 2004

WIPO PCT

20 AUG 2004



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts A02 110 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 03/00536	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20.02.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20.02.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12M3/00		
Anmelder AMAXA GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - ☒ Grundlage des Bescheids
 - ☐ Priorität
 - ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04.09.2003	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 07.04.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter GONCALVES M L F C Tel. +49 89 2399-8127 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-28 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-25 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Zeichnungen, Figuren

1-17 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.
4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:
- ☐ Beschreibung, Seiten:
 - ☐ Ansprüche, Nr.:
 - ☐ Zeichnungen, Blatt:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 03/00536

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-25 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-25 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-25 |
| | Nein: Ansprüche: |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Teil V

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-6 040 184

D2: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 09, 30. Juli 1999 & JP 11 103858

D3: WO 01 70928

D4: EUROGENTEC: 'Easyject Plus User's Manual Passage' 10. Juli 1992, PAGE(S) 1-27,30-39, XP002200115.

2. Die nach Artikel 19(1) PCT beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen bringen keine Sachverhalte ein, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in Anmeldezeitpunkt hinausgehen (Artikel 19(2) PCT).

3. Die beanspruchte gemäß der Erfindung wird in keinem der im Recherchenbericht angeführten Dokumente offenbart und kann auch nicht in naheliegender Weise davon abgeleitet werden.

D1 offenbart ein Verfahren zur Einbringung von Nukleinsäuren und anderen biologisch aktiven Molekülen in der kern höherer Eukaryontischer Zellen mit Hilfe elektrischen Stroms. Die Zellen werden in einer Küvette mit 2 mm Elektroabstand inkubiert (siehe Beispiele).

D2 beschreibt eine Küvette aus durchsichtig Kunststoff, mit Wand Elektroden (siehe Zusammenfassung).

D3 betrifft ein Verfahren zur Elektroporation von Zellen unter Verwendung von lange Dauer elektrischen Feldpulses. Dafür werden auch die Küvetten mit Aluminium Elektroden und 2 mm Elektroabstand eingesetzt.

D4 offenbart Küvetten für Elektroporation, mit Aluminium Elektroden (siehe Seiten 12-13).

Der Gegenstand des Anspruchs 1 betrifft ein Behälter zur Aufnahme einer wässrigen Lösung, dadurch gekennzeichnet, das mindestens eine Elektrode aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial besteht, das zumindest auf eine Kunststoff basiert, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist, wobei die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 40-80 Gew.-% vorliegt.

Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist somit neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.

4. Der Gegenstand des Anspruchs 1 kann auch nicht in naheliegender Weise von dem im Recherchenbericht angeführten Dokumente abgeleitet werden (Artikel 33(3) PCT).

Die Gründe dafür sind folgende:

Die Behälter von Stand der Technik werden bei Elektroporation oder elektrofusion in Form von Küvetten mit eingelegten Elektroden aus Metall eingesetzt. Die Elektroden bestehen dabei zumeist aus Metall, wobei häufig Aluminium verwendet wird. Diese bekannten, handelsüblichen Küvetten, haben den Nachteil, dass bei der elektrischen Entladung Metallionen in die Pufferlösung abgegeben werden, die in geringer Konzentration zu einer unerwünschten Stimulierung der Zellen führen können und in höherer Konzentration toxisch auf die Zellen wirken.

Der Erfindungsgemäss Behälter, durch die Verwendung eines leitfähigen Kunststoffmaterials aus dotiertem Kunststoff, wobei die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 40-80 Gew.-% vorliegt, wird eine Freisetzung von Metallionen vermieden, so dass toxische Effekte auf lebende Zellen vermieden werden. Hierdurch kann auch die medizinische Kompatibilität der entstehenden Produkte erhöht werden.

Es hat sich auch überraschenderweise herausgestellt, dass bei den verwendeten dotierten Kunststoffen bei der Elektroporation in Bezug auf die transfektionseffizienzen verbesserte Ergebnisse gegenüber der Verwendung von Küvetten mit Aluminiumelektroden erzielt werden können.

5. Die Ansprüche 2-19 sind von Anspruch 1 abhängig und erfüllen damit ebenfalls die Erfordernisse des PCT in Bezug auf Neuheit und erfinderische Tätigkeit. Dasselbe trifft auf die Ansprüche 20-25 zu, die sich auf Verwendung und Herstellung dieser Behälter beziehen.

Patentansprüche

1. Behälter (20, 30) zur Aufnahme einer wässrigen Lösung, und insbesondere von Zellen, Zellerivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln, welcher zumindest teilweise von einer äußeren Begrenzung gebildet ist, die einen Innenraum zur Aufnahme der Lösung bildet, und welcher mindestens einen Bereich aufweist, der beim Anlegen einer elektrischen Spannung und einer anschließenden Entladung als Elektrode dient, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus einem leitfähigen Kunststoffmaterial besteht, das zumindest auf einem Kunststoff basiert, der mit mindestens einem leitfähigen Stoff dotiert ist, wobei die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 40 – 80 Gew.-% vorliegt.
2. Behälter nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Dotierung aus Kohlefasern, Graphit, Ruß und/oder Kohlenstoffnanotubes besteht.
3. Behälter nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 40 – 60 Gew.-%, bevorzugt 50 – 60 Gew.-%, insbesondere 55 – 60 Gew.-%, vorliegt.
4. Behälter nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Dotierung in dem Kunststoff in einer Konzentration von insgesamt 50 – 80 Gew.-%, bevorzugt 60 – 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 70 – 80 Gew.-%, insbesondere 74 – 76 Gew.-%, vorliegt.
5. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Kunststoff Polycarbonat, Polyetheretherketon, Polypropylen, Polyamid, Polyphenylensulfid oder ein Gemisch dieser Polymere ist oder zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert und/oder dass der Kunststoff ein intrinsisch leitender Kunststoff ist.

6. Behälter nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der intrinsisch leitende Kunststoff ein Polyanilin, Polyacetylen, Poly-para-phenylen, Poly-para-phenylensulfid, Polypyrrol, Polythiophen, Polypropylen oder ähnliches ist oder zumindest auf einem oder mehreren dieser Polymere basiert.
7. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Begrenzung (21, 31) aus Kunststoff, bevorzugt transparentem Kunststoff, gebildet ist.
8. Behälter nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Begrenzung (21, 31) aus dem gleichen Kunststoff besteht, auf dem auch die zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) basiert.
9. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) in die äußere Begrenzung (21, 31) integriert ist.
10. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass dieser zumindest zwei Elektroden (25, 26, 33, 34) aufweist, die aus dem gleichen Material bestehen.
11. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest zwei Elektroden (25, 26, 33, 34) aus unterschiedlichen Materialien bestehen.
12. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 25 - 45 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 40 Gew.-%, insbesondere 33 - 37 Gew.-%, Kohlefasern und 15 - 35 Gew.-%, vorzugsweise 20 - 30 Gew.-%, insbesondere 23 - 27 Gew.-%, Graphit dotiertem Polyamid, insbesondere Polyamid 66 oder Polyamid 6, besteht.

13. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 30 - 50 Gew.-%, vorzugsweise 35 - 45 Gew.-%, insbesondere 39 - 41 Gew.-%, Kohlefasern und 25 - 45 Gew.-%, vorzugsweise 30 - 40 Gew.-%, insbesondere 34 - 36 Gew.-%, Graphit dotiertem Polyamid, insbesondere Polyamid 66 oder Polyamid 6, besteht.
5
14. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 15 - 40 Gew.-% Kohlefasern und 1 - 40 Gew.-% Graphit dotiertem Polycarbonat besteht.
10
15. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 40 - 50 Gew.-% Kohlefasern dotiertem Polyetheretherketon besteht.
15
16. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 40 Gew.-% Kohlefasern dotiertem Polyamid, vorzugsweise Polyamid 66, besteht.
- 20 17. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 40 Gew.-% Kohlefasern dotiertem Polypropylen besteht.
- 25 18. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus mit 40 - 50 Gew.-% Kohlefasern dotiertem Polyphenylensulfid besteht.
- 30 19. Behälter nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die äußere Begrenzung (21, 31) zumindest eine Öffnung zum Zuleiten der Lösung und zumindest eine Öffnung zum Ableiten der Lösung aufweist.

20. Behälteranordnung bestehend aus wenigstens zwei, vorzugsweise 6, 12, 24, 48, 96 oder mehr, Behältern (20, 30) nach einem der Ansprüche 1 bis 18, die zu einer Einheit verbunden sind.
- 5 21. Verfahren zur Herstellung der Behälter oder Behälteranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter (20, 30) oder die Behälteranordnung im 2-Komponenten-Spritzguss hergestellt wird, wobei zunächst die äußere Begrenzung (21, 31) mit
10 zumindest in das mindestens eine Fenster das leitfähigen Kunststoffmaterial aus dotiertem Kunststoff eingespritzt wird, oder wobei zunächst die mindestens eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus dem dotierten Kunststoff gespritzt wird und anschließend um die mindestens eine
15 Elektrode (25, 26, 33, 34) herum die äußere Begrenzung (21, 31) gespritzt wird.
22. Verfahren zur Behandlung von Zellen, Zellderivaten, subzellulären Partikeln und/oder Vesikeln mit elektrischem Strom, insbesondere zur Elektroporation oder Elektrofusion, umfassend:
- 20 a) Überführen der Zellen, Zellderivate, subzellulären Partikel und/oder Vesikel in den Innenraum zumindest eines Behälters (20, 30) nach einem der Ansprüche 1 bis 19 oder zumindest eines Behälters einer Behälteranordnung nach Anspruch 20, wobei der Behälter (20, 30) mindestens eine Elektrode (25, 26, 33, 34) aus dem dotierten
25 Kunststoff aufweist, sowie zumindest eine weitere Elektrode (25, 26, 33, 34) vorgesehen ist, und
- b) Anlegen einer elektrischen Spannung an die Elektroden (25, 26, 33, 34) und Erzeugung eines Stromflusses im Innenraum (22, 32) des Behälters (20, 30).
- 30 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der elektrische Strom eine Stromdichte von bis zu 120 A/cm^2 , vorzugsweise 80 A/cm^2 , erreicht.

24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei biologisch aktive Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren, in der Lösung gelöst sind und durch einen Spannungspuls mit einer Feldstärke von 2 bis $10 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ und einer Dauer von 10 bis $200 \mu\text{s}$ ein Einbringen dieser biologisch aktiven Moleküle in lebende Zellen erreicht wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Einbringen der biologisch aktiven Moleküle in die Zellen durch einen auf den Spannungspuls ohne Unterbrechung folgenden Stromfluss mit einer Stromdichte von 2 bis 14 A/cm^2 , vorzugsweise 5 A/cm^2 , und einer Dauer von 1 bis 100 ms, vorzugsweise 50 ms, erreicht wird.